

# 饲料蛋白质和蛋氨酸对水貂皮肤内毛皮发育 相关基因表达的影响

张海华<sup>1</sup> 李光玉<sup>1</sup> 常忠娟<sup>1</sup> 张铁涛<sup>1</sup> 钟伟<sup>1</sup> 周宁<sup>2</sup>  
孙伟丽<sup>1</sup> 赵靖波<sup>1</sup> 杨福合<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院特产研究所, 特种经济动物分子生物学重点实验室, 长春 130112;

2. 延边大学农学院, 延吉 133002)

**摘要:** 本试验旨在研究饲料蛋白质水平和蛋氨酸添加对水貂皮肤内毛皮发育相关基因表达的影响。选取 125 日龄体重相近的健康雄性水貂 56 只, 平均分为 A、B、C、D 4 组, 每组 14 个重复。A、B、C 组分别饲喂蛋白质水平为 32%、24% 和 16% 的饲料; D 组饲喂蛋白质水平为 24% 的饲料, 同时补充 0.8% 的 DL-蛋氨酸。试验水貂饲喂 85 d 时, 每组取 4 只体重相近的健康水貂屠宰, 并取腹部侧皮肤样品, 提取皮肤组织总 RNA, 反转录后扩增胰岛素样生长因子 - I (*IGF-I*) 及其受体 (*IGF-IR*)、表皮生长因子 (*EGF*) 和  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 基因, 用实时荧光定量 PCR 法分析各组水貂皮肤 *IGF-I*、*IGF-IR* 和 *EGF* 基因的相对表达量。结果表明: 饲料蛋白质水平与中等蛋白质水平 (24%) 饲料中添加蛋氨酸对水貂皮肤中 *IGF-I*、*IGF-IR* 和 *EGF* 基因的相对表达量有极显著的影响 ( $P < 0.01$ ), 饲喂 32% 蛋白质水平饲料的水貂皮肤中 3 种基因的相对表达量极显著高于饲喂 16% 蛋白质水平的饲料 ( $P < 0.01$ ), 当中等蛋白质水平饲料中补充蛋氨酸后, 水貂皮肤中 3 种基因的相对表达量极显著高于饲喂 16% 和 24% 蛋白质水平的饲料 ( $P < 0.01$ ), 其中 *IGF-I*、*IGF-IR* 基因的相对表达量与饲喂 32% 蛋白质水平饲料差异不显著 ( $P > 0.05$ ), *EGF* 基因的相对表达量极显著低于饲喂 32% 蛋白质水平饲料 ( $P < 0.01$ )。由此可见, 饲料高蛋白水平和中等蛋白质水平饲料中添加蛋氨酸能够促进水貂皮毛的生长发育。

**关键词:** 蛋白质; 蛋氨酸; 水貂; 基因表达

**中图分类号:** S816

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1006-267X(2014)01-0177-07

水貂是珍贵的毛皮动物, 蛋白质是毛皮动物最主要的营养素之一。毛发主要是角蛋白, 角蛋白形成的主要来源是饲料中的蛋白质, 因此研究饲料中的蛋白质对调节动物毛绒生长的作用机理, 充分发挥蛋白质的营养作用, 从而提高毛皮动物生产性能具有十分重大的意义。大量研究证明, 增加饲料中粗蛋白质的采食量和吸收量, 对于绵羊、安哥拉山羊、内蒙古绒山羊、蓝狐、安哥拉兔等毛皮动物毛纤维的生长有很大的促进作用<sup>[1-4]</sup>。

蛋白质主要是分解为氨基酸后被动物利用, 含硫氨基酸是毛皮动物的第一限制性氨基酸<sup>[5]</sup>, Mata 等<sup>[6]</sup>研究表明, 随着饲料中蛋氨酸含量的增加, 羊毛纤维直径、羊毛产量及羊的活体重量都显著增加。Työppönen 等<sup>[7]</sup>的研究结果表明, 低蛋白质水平饲料中补充蛋氨酸时, 与高蛋白质水平饲料相比对蓝狐毛皮品质影响的差异不大。此外, Zhang 等<sup>[8]</sup>和 Dahlman<sup>[9]</sup>研究表明, 适当降低蓝狐饲料蛋白质水平, 补充足够量的可消化含硫氨基酸时,

收稿日期: 2013-07-22

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (200903014)

作者简介: 张海华 (1983—), 女, 河北承德人, 博士研究生, 研究方向为特种经济动物营养与分子营养。E-mail: zhh83@126.com

\* 通讯作者: 杨福合, 研究员, 博士生导师, E-mail: yangfh@126.com

对冬毛期蓝狐的毛皮品质无显著影响。因而从分子水平上来解释蛋白质和含硫氨基酸对水貂毛发生长的调控机理,有助于阐明水貂在特定饲料条件下对蛋白质和含硫氨基酸的需要量。胰岛素样生长因子-Ⅰ(*IGF-Ⅰ*)、胰岛素样生长因子-Ⅰ受体(*IGF-ⅠR*)和表皮生长因子(*EGF*)基因广泛存在于动物皮肤及毛囊中,在毛发生长过程中发挥着重要的作用<sup>[10-12]</sup>。目前,关于饲料蛋白质水平和蛋氨酸的添加对水貂皮肤组织中 *IGF-Ⅰ*、*IGF-ⅠR* 和 *EGF* 基因表达影响的报道很少。为此,本试验采用实时荧光定量 PCR 方法研究饲料中不同蛋白质水平和蛋氨酸的添加对水貂皮肤中 *IGF-Ⅰ*、*IGF-ⅠR* 和 *EGF* 基因表达的影响,旨在阐明饲料蛋白质和蛋氨酸对水貂毛皮发育的作用,为蛋白质及含硫氨基酸对毛皮发育机理研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 试验动物

选用 125 日龄平均初始体重为  $(1.95 \pm 0.20)$  kg、身体健康的雄性水貂 56 只,分为 4 组,每组 14 个重复,分别为 A 组(饲料蛋白质水平为 32%)、B 组(饲料蛋白质水平为 24%)、C 组(饲料蛋白质水平为 16%)和 D 组(饲料蛋白质水平为 24%,同时添加 0.8% *DL*-蛋氨酸),试验预试期 5 d,正试期 80 d。整个试验期内由固定饲养人员进行专门的饲养管理。动物每天早晚各饲喂 1 次,早饲喂量为全天饲料的 40%,晚饲喂量为 60%,自由饮水。

#### 1.1.2 试验饲料

根据水貂常用鲜动物性饲料原料配制不同蛋白质水平的试验饲料。试验饲料组成及营养水平见表 1。

#### 1.1.3 样品采集

正试期第 80 天时,进行屠宰试验,每组选 4 只体重相近的水貂取腹侧部皮肤样品,置于焦碳酸二乙酯(*diethyl pyrocarbonate*, *DEPC*)处理过的冻存管中,立即放入液氮中保存备用。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 总 RNA 提取与检验

利用总 RNA 提取试剂盒(*Bioteke Corporation*)提取水貂皮肤组织中总 RNA,溶于经 *DEPC*

处理的超纯水中,用紫外分光光度计检测 RNA,  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  在 1.8 ~ 2.0 证明提取的总 RNA 纯度符合试验要求。同时提取的总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,确定其完整性。

#### 1.2.2 RNA 反转录

在无 RNA 酶污染的环境中,应用 TaKaRa 试剂盒中反转录试剂盒说明书,配制 10  $\mu\text{L}$  反转录反应体系,总 RNA 1.2  $\mu\text{L}$ ,  $5 \times \text{PrimeScript}^{\text{®}}$  Buffer (for Real Time) 2  $\mu\text{L}$ , *PrimeScript*<sup>®</sup> RT Enzyme Mix 0.5  $\mu\text{L}$ , Oligo dT Primer 0.5  $\mu\text{L}$ , Random 6 mers 0.5  $\mu\text{L}$ , RNase Free  $\text{dH}_2\text{O}$  5.3  $\mu\text{L}$ 。将上述 PCR 管中的溶液混合均匀,在以下反应条件下进行反应,42  $^{\circ}\text{C}$ , 15 min(反转录反应),85  $^{\circ}\text{C}$ , 5 s(反转录酶的失活反应),4  $^{\circ}\text{C}$  保存,结束反应。

#### 1.2.3 引物合成

根据 GenBank 中人、鼠的  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)序列(登录号: NM\_001101.3; NM\_007393.3)、*IGF-Ⅰ*序列(登录号: NM\_000618.3; NM\_001111276.1)、*IGF-ⅠR*序列(登录号: BC113612; NM\_052807.2)和 *EGF*序列(登录号: NM\_001178130.1; NM\_010113.3),利用 DNASTAR 软件找出其保守区域、利用引物分析软件 Primer 5.0 分析设计其特异性引物。用  $\beta$ -actin 作为内参基因,实时荧光定量 PCR 引物详细信息见表 2(引物由大连宝生物公司合成)。

#### 1.2.4 PCR 扩增反应

按照 TaKaRa 公司反转录试剂盒,配制 50  $\mu\text{L}$  反应体系,  $10 \times \text{Buffer}$  5  $\mu\text{L}$ , dNTP 4  $\mu\text{L}$ , 上游引物(F) 2  $\mu\text{L}$ , 下游引物(R) 2  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , *r-Taq* 酶 0.26  $\mu\text{L}$ ,  $\text{dH}_2\text{O}$  34.74  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 引物的复性温度根据所有引物退火温度范围设置梯度,均在 55 ~ 65  $^{\circ}\text{C}$ , 此步骤持续时间均为 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 35 个循环,最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存,结束反应。

#### 1.2.5 实时荧光定量 PCR

确定好反应温度后,利用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (TaKaRa) 对  $\beta$ -actin、*IGF-Ⅰ*、*IGF-ⅠR* 和 *EGF* 基因进行扩增,同时建立标准曲线,反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 10  $\mu\text{L}$ , PCR Forward Primer 0.8  $\mu\text{L}$ , PCR Reverse Primer 0.8  $\mu\text{L}$ , ROX Reference Dye II 0.4  $\mu\text{L}$ , cDNA

2 μL,dH<sub>2</sub>O 6 μL。反应条件为预变性 95 ℃、 环);95 ℃,60 s;60 ℃,60 s。扩增结束后进行熔  
30 s;变性 95 ℃,5 s;复性 60 ℃,35 s(40 个循 解曲线及结果分析,60 ℃,10 s(71 个循环)。

表 1 试验饲料组成及营养水平

Table 1 Composition and nutrient levels of experimental diets

%

项目 Items	组别 Groups			
	A	B	C	D
原料(风干基础) Ingredients (air-dry basis)				
黄花鱼 Corvina	28.80	19.20	9.20	19.20
鸡杂 Poultry offal	5.90	5.60	5.60	5.60
鸡蛋 Eggs	4.50	2.10	2.10	2.10
肥猪肉 Jarding pork	14.50	20.50	20.50	20.50
羊肝 Hircine liver	6.50	4.80	2.40	4.80
膨化玉米 Extruded corn	38.80	46.80	59.20	46.00
食盐 NaCl	0.50	0.50	0.50	0.50
蛋氨酸 Methionine				0.80
预混料 Premix <sup>1)</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平(干物质基础) Nutrient levels (DM basis) <sup>2)</sup>				
粗蛋白质 Crude protein	32.64	24.93	17.28	25.79
粗脂肪 Crude fat	22.50	22.98	21.83	21.83
代谢能 ME/(MJ/kg)	18.52	18.32	17.53	18.16
钙 Ca	1.65	1.33	1.17	1.09
磷 P	0.79	0.64	0.61	0.70
蛋氨酸 Methionine	1.08	0.72	0.40	1.54
半胱氨酸 Cysteine	1.41	1.18	0.98	1.28
赖氨酸 Lysine	1.42	1.03	0.68	1.20

<sup>1)</sup>预混料为每千克饲料提供 The premix provided the following per kg of diets: VA 300 IU,VB<sub>1</sub> 0.15 mg,VB<sub>2</sub> 0.40 mg, VB<sub>6</sub> 0.30 mg, 叶酸 folic acid 0.30 mg, 烟酸 nicotinic acid 1.60 mg,*D* - 泛酸 *D*-pantothenic acid 1.3 mg, Ca (as CaHPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O) 6.4 mg,P [as Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O] 4.4 mg,Mg (as MgO) 1.6 mg,Na (as NaCl) 24 mg,Fe (as FeSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O) 16 mg,Cu (as CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O) 4.0 mg,Zn (as ZnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O) 10 mg,Mn (as MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O) 12 mg。

<sup>2)</sup>代谢能为计算值,其余均为实测值。ME was a calculated value, while the others were measured values.

表 2 实时荧光定量 PCR 引物详细信息

Table 2 Detailed information of real-time fluoescence quantitative PCR primers

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'—3')	引物长度 Primer length/ bp	退火温度 Annealing temperature/℃	片段大小 Fragment size/ bp
β - 肌动蛋白	F:GCGTGACATCAAGGAAGAAGC	21	59.97	87
β-actin	R:CCGTCGGGTAGTTCGTAGCT	20	61.90	
胰岛素样生长因子 - I	F:AGGCATTGTGGATGAGTGTTC	22	60.07	117
<i>IGF- I</i>	R:GGACTTCTGAGTCTTGGGCATG	22	61.94	
胰岛素样生长因子 - I 受体	F:AAGAATCGCATCATCATCACGT	22	56.35	147
<i>IGF- I R</i>	R:GAGGGAGGTCCACATCTACCATA	23	61.95	
表皮生长因子	F:ATGTGGCTGCTTTCCTGGGTA	21	59.97	118
<i>EGF</i>	R:CAGGGTTCATAATCTGTTCCATC	24	60.26	

1.3 数据统计分析

利用实时荧光定量 PCR 分别检测出目的基因和内参基因,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法分析基因相对表达差异量, 试验数据采用统计软件 SAS 8.0 的一般线性模型 (GLM) 模块进行的单因素方差分析。表中的结果均为“平均值  $\pm$  标准差” ( $\bar{X} \pm SD$ ), 其中  $P < 0.05$  为差异显著,  $P < 0.01$  为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 及目的基因片段检测结果

取 2  $\mu$ L 总 RNA, 利用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 如图 1 所示。紫外分光光度计测定  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  在 1.8 ~ 2.0, 表明总 RNA 无降解, 符合试验纯度, 可以进行反转录试验。 $\beta$ -actin、*IGF- I*、*IGF- I R* 和 *EGF* 基因经 3% 琼脂糖凝胶电泳, 发现条带与所预计的产物很相近, 如图 2 所示, 各对引物 PCR 扩增后的条带清晰, 无杂带, 片段大小符合引物设计要求。测序后与目的序列一致性为 100%, 为目的基因片段。这进一步说明了合成的 cDNA 可以用来进行实时荧光定量 PCR 反应。

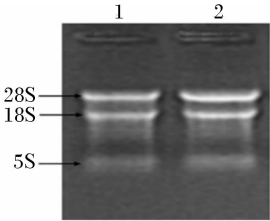


图 1 水貂皮肤总 RNA 电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis result of total RNA of mink skin

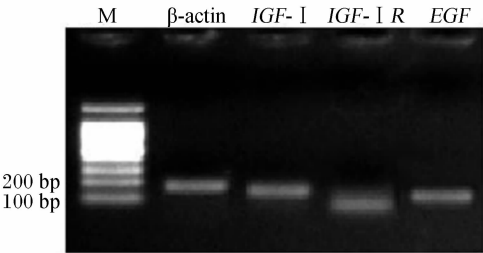


图 2 目的基因检测结果

Fig. 2 Result of object genes test

2.2 *IGF- I*、*IGF- I R* 及 *EGF* 基因在水貂皮肤组织中表达的差异

饲料蛋白质水平和蛋氨酸添加对水貂毛皮相关基因表达的影响见表 3。

表 3 饲料蛋白质水平和蛋氨酸添加对水貂毛皮相关基因表达的影响

Table 3 Effects of dietary protein level and methinon supplementation on fur related gene expressions

组别 Groups	基因 Genes		
	胰岛素样生长因子 - I	胰岛素样生长因子 - I 受体	表皮生长因子
	<i>IGF- I</i>	<i>IGF- I R</i>	<i>EGF</i>
A 组 Group A	1.12 $\pm$ 0.04 <sup>AB</sup>	1.48 $\pm$ 0.02 <sup>A</sup>	1.19 $\pm$ 0.04 <sup>A</sup>
B 组 Group B	1.05 $\pm$ 0.02 <sup>BC</sup>	1.25 $\pm$ 0.09 <sup>B</sup>	1.02 $\pm$ 0.01 <sup>C</sup>
C 组 Group C	1.01 $\pm$ 0.02 <sup>C</sup>	1.21 $\pm$ 0.03 <sup>B</sup>	1.03 $\pm$ 0.02 <sup>C</sup>
D 组 Group D	1.15 $\pm$ 0.06 <sup>A</sup>	1.41 $\pm$ 0.07 <sup>A</sup>	1.13 $\pm$ 0.09 <sup>B</sup>
P 值 P-value	0.004 5	0.001 1	0.000 1

同列数据肩标不同大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 相同大写字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。  
Values in the same row with different capital letter superscripts differ significantly ( $P < 0.01$ ), while with the same capital letter superscripts mean no significant difference ( $P > 0.05$ ).

可以看出, 饲料蛋白质水平与中等蛋白质水平 (24%) 饲料中补充蛋氨酸对水貂皮肤中 *IGF- I*、*IGF- I R* 和 *EGF* 基因的相对表达量均有极显著的影响 ( $P < 0.01$ )。随着饲料蛋白质水平的降低, *IGF- I* 和 *IGF- I R* 基因的相对表达量逐渐下降, 但 B 组和 C 组之间差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 当中等蛋白质水平饲料中补充蛋氨酸 (D

组) 后, 水貂皮肤中 *IGF- I* 和 *IGF- I R* 基因的相对表达量极显著的高于 B 组和 C 组 ( $P < 0.01$ ), 但与 A 组差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 水貂皮肤中 *EGF* 基因 B 组和 C 组极显著低于 A 组 ( $P < 0.01$ ), 且中等蛋白质水平饲料中补充蛋氨酸后, 水貂皮肤中 *EGF* 基因极显著高于 B 组和 C 组 ( $P < 0.01$ ), 但仍极显著低于 A 组 ( $P < 0.01$ )。从表中可以看

出,水貂皮肤中 *IGF-I*、*IGF-IR* 和 *EGF* 3 种基因,*IGF-IR* 的相对表达量相对较高,*IGF-I* 和 *EGF* 的相对表达量相对较低,且两者差异不明显。

### 3 讨论

本试验结果显示,随着饲料蛋白质水平的提高和中等蛋白质水平饲料中蛋氨酸的添加,水貂皮肤中 *IGF-I*、*IGF-IR* 和 *EGF* 基因的相对表达量均有极显著的增加趋势。大量研究表明,在小鼠、绵羊、鸡等动物上,饲料蛋白质水平对动物肝脏中的 *IGF-I* 基因的相对表达量及血清中的 *IGF-I* 含量具有显著影响,该基因的相对表达量与饲料蛋白质水平呈正相关<sup>[13-16]</sup>。此外,荣风梅等<sup>[17]</sup>研究表明,当饲料中添加不同水平的蛋氨酸时,随着蛋氨酸水平的增加新西兰肉兔肝脏组织中 *IGF-I* 基因的相对表达量有上升的趋势。Carew 等<sup>[18]</sup>试验表明,8~22 日龄的雄性肉鸡饲料中蛋氨酸缺乏时,对肉鸡血清中 *IGF-I* 的含量没有显著的影响,但 *IGF-I* 基因在组织中的相对表达量会显著降低。本试验结果显示,中等蛋白质水平饲料中添加蛋氨酸对 *IGF-I*、*IGF-IR* 和 *EGF* 基因相对表达量有极显著的提高作用。*IGF-I* 对维持和调节动物毛发的生长是必不可少的,尤其是在毛周期的初期,*IGF-I* 对防止毛囊过早的进入中期具有重要的调节作用<sup>[19]</sup>。大量研究结果表明,当提高饲料中蛋白质水平或蛋氨酸含量时对动物毛发的生长有显著的提高作用<sup>[2-3]</sup>,且外源性的 *IGF-I* 能够显著促进体外毛囊的生长发育,同时影响毛囊的形态<sup>[20-21]</sup>。可见在饲料的蛋白质和蛋氨酸调节水貂毛发的生长过程中,*IGF-I* 是其发挥作用的重要信号传导因子之一,或直接作用于毛囊或需要其他生长因子的共同协调参与。

关于饲料蛋白质和蛋氨酸水平对 *IGF-I* 及其受体基因相对表达量差异及其机制研究比较多,而对 *EGF* 基因的相对表达量研究相对较少。*EGF* 作为一种生长因子,同其他生长因子一样与饲料中营养成分有很大的相关性。Rogers 等<sup>[21]</sup>年研究发现,生长激素(GH)对 *EGF* 基因的表达与生成具有重要的调节作用。当饲料蛋白质水平和蛋氨酸的添加量提高时,可以显著地提高血液中 GH 的含量,饲料中的蛋白质和蛋氨酸水平可能通过 GH 来调节 *EGF* 基因的表达<sup>[22]</sup>。Ekberg 等<sup>[23]</sup>研究发现,当给大鼠外源性的 GH 时,可以显著地提高大

鼠肝脏中 *EGF* 及其受体基因的表达水平,而且能够有效提高 *EGF* 与其受体的结合能力。本试验结果显示随着饲料蛋白质水平的下降,*EGF* 基因的相对表达量有降低趋势,这可能与饲料营养成分的不足而引起 GH 的量减少有关,但具体机理尚不明确。研究发现,*EGF* 及其受体在成熟的毛囊中分布广泛,主要分布在外根鞘、角朊细胞、皮脂腺和毛囊的上皮等部分<sup>[24]</sup>。姚玉园等<sup>[25]</sup>研究表明 *EGF* 对毛囊生长有正向调节作用,且适当浓度的 *EGF* 能够显著促进体外毛囊生长<sup>[26-27]</sup>,分析原因可能是真皮鞘细胞在一定条件下转化为毛乳头细胞,从而促进了毛囊生长。具体 *EGF* 基因如何调节毛发的机理有待于进一步研究。

### 4 结论

饲料高蛋白质水平和中等蛋白质水平饲料中蛋氨酸的添加能够促进水貂皮肤中 *IGF-I*、*IGF-IR* 及 *EGF* 基因的表达。

### 参考文献:

- [1] BLOMSTEDT L. Pelage development in mink, ferret, and blue fox, and some influence factors [D]. Ph. D. Thesis. Finland: Department of Biosciences, University of Helsinki, 1998:36.
- [2] 孙海洲,侯先志,红梅. 内蒙古阿尔巴斯白绒山羊皮肤毛囊发育及其活性变化规律的研究 [J]. 内蒙古畜牧科学, 1998, 19(4): 3-6.
- [3] 彭玉麟,贾志海,卢德勋,等. 不同蛋白质水平的日粮对内蒙古白绒山羊消化代谢的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(4): 321-326.
- [4] RASMUSSEN P V, BØRSTING C F. Effects of variations in dietary protein levels on hair growth and pelt quality in mink (*Mustela vison*) [J]. Canadian Journal of Animal Science, 2000, 80(4): 633-642.
- [5] GLEM-HANSEN N. Review of protein and amino acid requirements for mink [J]. Scientifur, 1992, 16(2): 122-141.
- [6] MATA G, MASTERS D G, BUSCALL D. Responses in wool growth, live weight, glutathione and amino acids, in Merino wethers fed increasing amounts of methionine protected from degradation in the rumen [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 1995, 46(6): 1189-1204.
- [7] TYÖPPÖNEN J, BERG H, VALTONEN M. Effects of dietary supplementation of methionine and lysine on

- milk parameters and fur quality in blue fox during low-protein feeding [J]. *Agricultural Science in Finland*, 1987, 59: 355–360.
- [8] ZHANG H H, LI G Y, LIU B Y, et al. Effects of low-protein, *DL*-methionine and lysine-supplemented diets on growth performance, N-balance and fur characteristics of blue foxes (*Alopex lagopus*) during the growing-furring period [J]. *Acta Zoonutrimenta Sinica*, 2010, 22(6): 1614–1624.
- [9] DAHLMAN T. Protein and amino acids in the nutrition of the growing-furring blue fox [D]. Ph. D. Thesis. Finland: University of Helsinki, 2003: 33.
- [10] 杨淑霞, 钟志红, 秦俭, 等. 表皮生长因子对游离毛囊生长的影响 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2000(2): 99.
- [11] STENN K S, PAUS R. Controls of hair follicle cycling [J]. *Physiological Reviews*, 2001, 81(1): 449–494.
- [12] 李岩, 廖和荣, 李知勉, 等. IGF-1 对不同绵羊皮肤中 5 个毛囊相关生长因子基因表达的影响 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(3): 594–600.
- [13] VANDEHAAR M J, MOATS-STAATS B M, DAVENPORT M L, et al. Reduced serum concentrations of insulin-like growth factor- I (IGF- I) in protein-restricted growing rats are accompanied by reduced *IGF- I* mRNA levels in liver and skeletal muscle [J]. *Journal of Endocrinology*, 1991, 130(2): 305–312.
- [14] PELL J M, SAUNDERS J C, GILMOUR R S. Differential regulation of transcription initiation from insulin-like growth factor- I (IGF- I) leader exons and of tissue *IGF- I* expression in response to changed growth hormone and nutritional status in sheep [J]. *Journal of Endocrinology*, 1993, 132(4): 1797–1807.
- [15] LAUTERIO T J, SCANES C G. The role of thyroid hormones in the growth hormone response to protein restriction in the domestic fowl (*Gallus domesticus*) [J]. *Journal of Endocrinology*, 1988, 117(2): 223–228.
- [16] ROSEBROUGH R W, MCMURTRY J P. Protein and energy relationships in the broiler chicken. Effects of protein quantity and quality on metabolism [J]. *British Journal of Nutrition*, 1993, 70: 667–678.
- [17] 荣凤梅, 谭兴智. 日粮中添加蛋氨酸对生长肉兔肝脏中 IGF- I mRNA 表达量的影响 [J]. *中国动物检疫*, 2010, 27(9): 39–41.
- [18] CAREW L B, MCMURTRY J P, ALSTER F A. Effects of methionine deficiencies on plasma levels of thyroid hormones, insulin-like growth factors- I and - II, liver and body weights, and feed intake in growing chickens [J]. *Journal of Poultry Science*, 1987, 82: 1932–1938.
- [19] 李知勉. 毛囊相关生长基因的表达对绵羊毛囊生长的影响 [D]. 硕士学位论文. 石河子: 石河子大学, 2006.
- [20] ADAMS N R, BRIEGEL J R, THOMPSON M J, et al. Metabolic hormones and tissue concentrations of mRNA for *IGF- I* in lines of sheep that differ in their protein synthesis response to feed intake [J]. *The Journal of Endocrinology*, 2000, 167(2): 315–320.
- [21] ROGERS S A, RASMUSSEN J, MILLER S B, et al. Effects of growth hormone on rat renal epidermal growth factor expression [J]. *American Journal of Physiology*, 1994, 267(2): 208–214.
- [22] 贾斌, 赵茹茜, 剡根强, 等. 半胱胺对羊毛生长及皮肤中 GH 受体、IGF-1 受体和 IGF-1 型受体基因表达的影响 [J]. *南京农业大学学报*, 2005, 28(1): 80–84.
- [23] EKBERG S L, CARLSSON B, CARLSSON H, et al. Plasma growth hormone pattern regulates epidermal growth factor (EGF) receptor messenger ribonucleic acid levels and EGF binding in the rat liver [J]. *Endocrinology*, 1989, 125: 2158–2166.
- [24] WYNN P C, BROWN G, MOORE G P. Characterization and distribution of epidermal growth factor receptors in the skin and wool follicles of the sheep fetus during development [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 1995, 12(3): 269–281.
- [25] 姚玉园, 刘海英, 袁纓, 等. IGF-1 和 EGF 对辽宁绒山羊初级毛囊体外培养的影响 [J]. *沈阳农业大学学报*, 2010, 41(2): 165–169.
- [26] BATES E J, HYND P I, PENN N M, et al. Serum-free culture of wool follicles: effects of nutrients growth factors and hormones [J]. *British Journal of Dermatology*, 1997, 137(4): 498–505.
- [27] 赵宗胜, 王根林, 李大全, 李桂芳. IGF-1 和 EGF 对绵羊毛囊体外培养的影响 [J]. *南京农业大学学报*, 2006, 29(2): 138–141.

## Effects of Dietary Protein and Methionine on Fur Development Related Gene Expressions in Skin of Minks

ZHANG Haihua<sup>1</sup> LI Guangyu<sup>1</sup> CHANG Zhongjuan<sup>1</sup> ZHANG Tietao<sup>1</sup> ZHONG Wei<sup>1</sup>  
ZHOU Ning<sup>2</sup> SUN Weili<sup>1</sup> ZHAO Jingbo<sup>1</sup> YANG Fuhe<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economic Animals, Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Changchun 130112, China; 2. Agriculture College, Yanbian University, Yanji 133002, China)

**Abstract:** This experiment was conducted to investigate the effects of dietary protein and methionine on fur development related gene expressions in skin of minks. Fifty-six male minks aged 125 days were divided into 4 groups (groups A, B, C and D) with 14 replicates per group. Minks in groups A, B and C were fed the diets with 32%, 24% and 16% protein levels, respectively, and those in group D were fed 24% protein level diet with 0.8% *DL*-methionine supplementation. Four minks with similar body weight from each group were slaughtered to collect the samples of belly skin on day 85. Total RNAs were extracted from the skin tissues, and then insulin-like growth factor- I (*IGF- I*), insulin-like growth factor- I receptor (*IGF- I R*), epidermal growth factor (*EGF*) and  $\beta$ -actin genes were amplified after reverse transcription. Finally, the expressions of *IGF- I*, *IGF- I R* and *EGF* genes in mink's skin were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed as follows: *IGF- I*, *IGF- I R* and *EGF* gene expressions were significantly affected by different dietary protein levels and methionine supplementation in 24% protein diet ( $P < 0.01$ ), those in group A were significantly higher than those in group C ( $P < 0.01$ ), and those in group D were significantly higher than those in groups B and C ( $P < 0.01$ ). The expressions of *IGF- I* and *IGF- I R* genes in group D were not significantly different from those in group A ( $P > 0.05$ ), but the expression of *EGF* gene was significantly lower than that in group A ( $P < 0.01$ ). It is concluded that high dietary protein level and low protein diet adding methionine can improve growth and development of fur in minks. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(1):177-183]

**Key words:** protein; methionine; mink; gene expression